製品コード RR272A

研究用

TaKaRa

# Virus Test Kit (EBV, CMV, WNV)

説明書

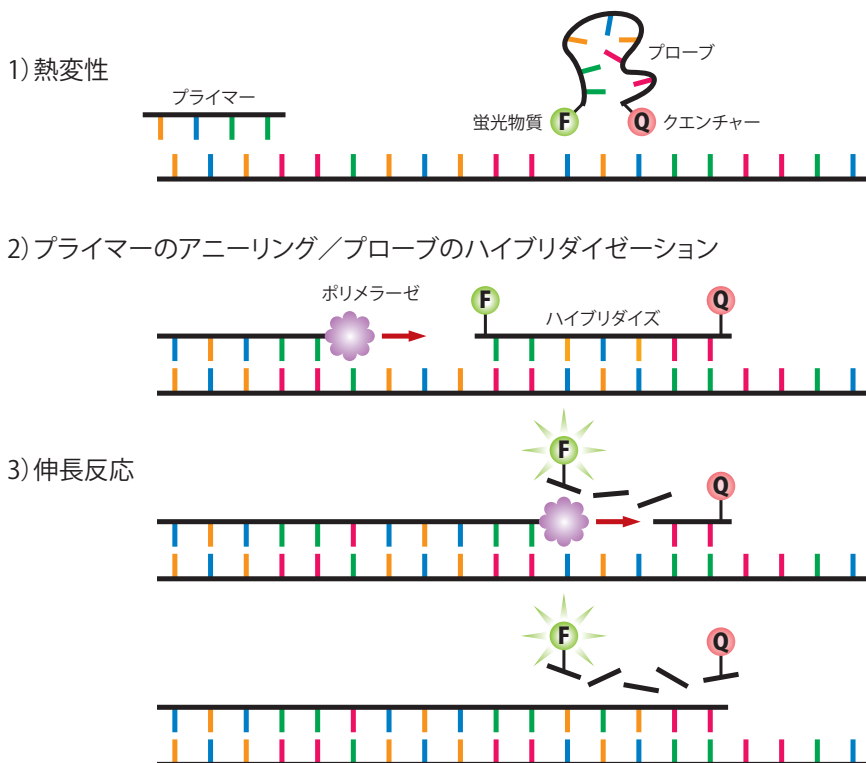
v201508

本製品は、3 種類のウイルス（WNV、EBV、CMV）を Thermal Cycler Dice® Real Time System を使用してリアルタイム RT-PCR により検出するためのキットです。各ウイルス検出用の Primer/Probe は、予めリアルタイム PCR 反応用のチューブに固相化されていますので、チューブに反応液を添加し、反応を行うだけの簡単な操作で 3 種類のウイルスを一括して検出することが可能です。

※本製品の開発には、東京医科歯科大学難治疾患研究所の清水則夫先生にご協力頂きました。

本製品では、操作が簡便で高感度なワンステップのリアルタイム RT-PCR 法を採用しており、検出には TaqMan® プローブを使用しています。

TaqMan プローブ法の原理

5′ 側を蛍光物質（FAM など）、3′ 側をクエンチャー物質（TAMRA など）で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。
アニール条件下では、TaqMan プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、*Taq* DNA ポリメラーゼの持つ 5′ → 3′exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズした TaqMan プローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

## I. キットの内容（12 テスト）

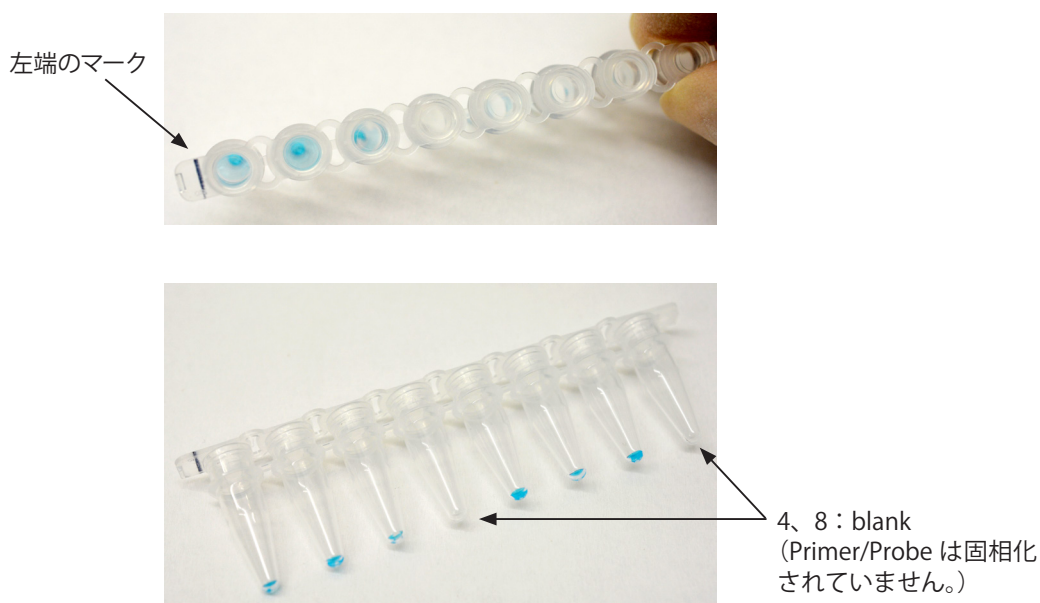
**Package 1**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | 2 × One Step RT-PCR Buffer III | | 625 μl |
| 2. | *TaKaRa Ex Taq*® HS | 5 U/μl | 25 μl |
| 3. | PrimeScript™ RT enzyme Mix II | | 25 μl |
| 4. | $dH_2O$ | | 1 ml |
| 5. | Positive Control Mix (3) | | 50 μl |

**Package 2**

| | |
|---|---|
| Primer/Probe Strip (3)＊ | 6 本 |
| Flat Cap | 6 本 |

＊：蛍光標識プローブを含んでいるため、遮光に留意してください。

4、8：blank
（Primer/Probe は固相化されていません。）

Primer/Probe Strip (3) の左端には、チューブの蓋にマーク（黒い線）があります（上図参照）。左から順番に、以下のウイルス検出用の Primer/Probe が固相化されています。

| | |
|---|---|
| 1：WNV | 5：WNV |
| 2：EBV | 6：EBV |
| 3：CMV | 7：CMV |
| 4：(blank) | 8：(blank) |

1 ～ 3、5 ～ 7 のウェルに含まれる Primer/Probe は青色に着色されており、固相化されていることが目視で確認できます。また、反応液を添加して Primer/Probe を溶解させると反応液が青色になるので、溶解状態を確認することができます。

## II.　保存

**Package 1：**－20℃（輸送・保存とも）
**Package 2：**4℃（輸送・保存とも）

## III.　キット以外に必要な試薬、機器など（主なもの）

・核酸抽出キット
　NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）＊など
　＊：別売りの Proteinase K（凍結乾燥品）（製品コード 740506）が必要です。

・リアルタイム PCR 装置
　Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
　Thermal Cycler Dice Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
　Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
　※ 本キットは、Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）を用いてバリデーションを行っています。

・ヒートブロック
・微量高速遠心機
・マイクロピペットおよびチップ

## IV.　操作上の注意

1. Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱いは各装置の取扱説明書に従ってください。
2. 万一、プローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。
3. 本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。
4. 本キットは Thermal Cycler Dice Real Time System での解析によって結果判定を行いますが、各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じて Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

## V. 操作

### V-1. サンプルの調製

検体から核酸（RNA および DNA）を抽出します。以下に、例として NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）および Proteinase K（製品コード 740506）を用いた場合の操作方法を紹介します。

このキットで検出可能なウイルスには、DNA ウイルスと RNA ウイルスの両方が含まれますので、DNase 処理は行わず、DNA と RNA をまとめて抽出します。また、一部の DNA ウイルスでは Proteinase K 処理を行うと DNA の収率が向上するため、Proteinase K 処理を行います。

1. サンプルの準備
   $1 \times 10^6$ 個の細胞を遠心等で回収する。
2. サンプルの溶解
   350 μl の Buffer RA1（1% Triton X-100 および 1 M DTT 3.5 μl を添加）を細胞に添加し、均一にホモジナイズする。
3. Proteinase K 処理
   1）590 μl の RNase-free water と 10 μl の Proteinase K＊1 を添加し、ピペッティングでよく混合する。
   2）室温で 10 分静置後、55℃で 10 分インキュベートする。
   3）10,000 × *g* で 3 分間遠心し、上清（約 950 μl）を新しいチューブに回収する。
4. エタノールの添加
   回収した上清の 0.5 ×容量（約 475 μl）のエタノール（>96%）を添加し、ボルテックスで混合する。
5. カラムへの吸着
   4. の溶液を NucleoSpin RNA Column（水色リング）に添加し、11,000 × *g* で 30 秒間遠心する。ろ液を捨て、再度、残りの溶液をカラムに添加し、11,000 × *g* で 30 秒間遠心する。カラムを新しい Collection Tube（2 ml）にセットする。
6. メンブレンの洗浄
   <u>1 回目の洗浄</u>
   200 μl の Buffer RAW2 をカラムに添加し、11,000 × *g* で 30 秒間遠心する。
   カラムを新しい Collection Tube（2 ml）にセットする。

   <u>2 回目の洗浄</u>
   700 μl の Buffer RA3＊2 をカラムに添加し、11,000 × *g* で 30 秒間遠心する。
   ろ液を捨てた後、再び同じ Collection Tube にセットする。

   <u>3 回目の洗浄</u>
   250 μl の Buffer RA3 をカラムに添加し、11,000 × *g* で 2 分間遠心する。
   カラムを新しい Collection Tube（1.5 ml）にセットする。
7. 核酸の溶出
   50 μl の RNase-free $H_2O$ をカラムに加え、11,000 × *g* で 1 分間遠心する。
   溶出された核酸溶液を再度カラムにアプライし、11,000 × *g* で 1 分間遠心する。
   溶出した核酸溶液（約 50 μl）は、－20℃または－70℃で保存する。

＊ 1：Proteinase K： 凍結乾燥品（50 mg/vial）に Proteinase Buffer 2.5 ml を加えて完全に溶解する。

＊ 2：Buffer RA3： Wash Buffer RA3（Concentrate）に 4 倍量のエタノール（>96%）を添加する。

### V-2.　リアルタイム PCR 反応液の調製

V-1. で調製した核酸溶液と本製品のリアルタイム PCR 試薬を混合して反応液を調製し、Primer/Probe Strip (3) の各ウェルに分注します。

（1）下記に示す反応液を氷上で調製する。
1 サンプルあたり 4 反応分（3 反応＋ 1）の反応液を調製する。
また、陰性コントロールとして核酸溶液のかわりに $dH_2O$、陽性コントロールとして Positive Control Mix (3) を加えたものもそれぞれ 4 反応分用意する。

| | 液量（1 反応） | （4 反応） |
|---|---|---|
| 2 × One Step RT-PCR Buffer III | 12.5 μl | 50 μl |
| *TaKaRa Ex Taq* HS | 0.5 μl | 2 μl |
| PrimeScript RT enzyme Mix II | 0.5 μl | 2 μl |
| 核酸溶液（or Positive Control Mix (3) or $dH_2O$） | 5 μl | 20 μl |
| $dH_2O$ | 6.5 μl | 26 μl |
| Total | 25 μl | 100 μl |

（2）反応液を Primer/Probe Strip (3) の各ウェルに分注する。

1）Primer/Probe Strip (3) の向きを確認し、チューブの蓋を外す。
2）1 ～ 3（または 5 ～ 7）のウェルに反応液を 25 μl ずつ分注する。
3）新しい Flat Cap でチューブの蓋をする。
4）軽くタッピングし、Primer/Probe が溶解したことを確認する。
※ Primer/Probe は青く着色されています。反応液がほぼ均一の青色になることを確認してください。

5）卓上遠心機で軽く遠心を行い、Thermal Cycler Dice Real Time System にセットする。

### V-3. リアルタイム PCR の開始

以下の反応条件でリアルタイム PCR を実施します。
詳しい操作方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System の説明書をご確認ください。

<u>RT-qPCR 条件</u>

逆転写反応
Cycle：1
42℃　5 分
95℃　30 秒

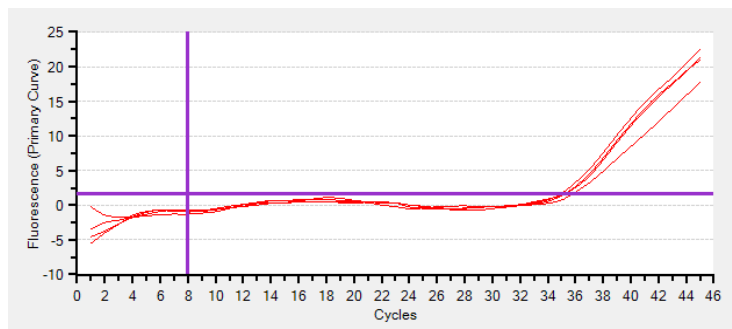
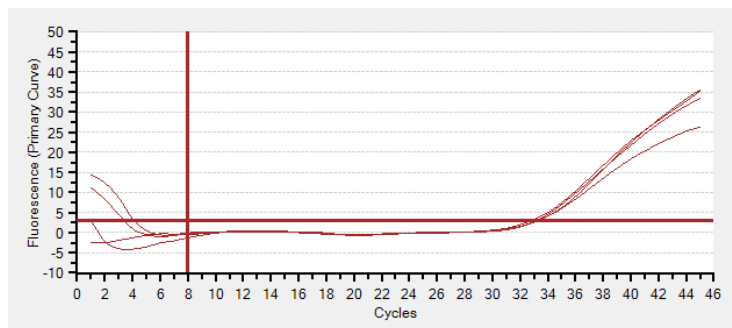
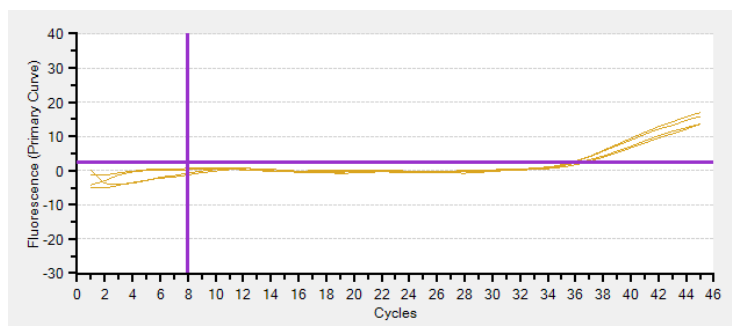
2 step PCR
Cycle：45
95℃　5 秒
56℃　30 秒（検出）

検出フィルター
FAM

## VI.　反応例

NIBSC より購入したウイルス株から抽出した核酸溶液等を鋳型として、本製品による検出を行った例を以下にご紹介します。

下表に示すウイルス株由来の核酸溶液等を鋳型として使用し、各 4 連でリアルタイム PCR 反応を実施した。なお、WNV に関しては、ウイルス株ではなく PCR 増幅配列を組み込んだプラスミド DNA を鋳型として使用した。

| ウイルス | Name | NIBSC Code | 1 反応当り |
|---|---|---|---|
| WNV | (Plasmid) | - | 250 copies |
| EBV | EBV 1st I. S. | 09/260 | 125 IU |
| CMV | HCMV for NAT 1st I. S. | 09/162 | 150 IU |

EBV

CMV

## VII. 関連製品

Virus Test Kit (HIV, HTLV, HCV, HBV, ParvoB19)（製品コード RR271A）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single（製品コード TP850/TP870）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
NucleoSpin RNA（製品コード 740955.10/.50/.250）
Proteinase K（凍結乾燥品）（製品コード 740506）

## VIII. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- *TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、TaqMan は Roche Diagnostics GmbH の登録商標です。PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201508